

**EFEK KEMOPREVENTIF EKSTRAK METANOL KULIT
KAYU KLUWIH (*Artocarpus communis* J.R.&G) PADA
KARSINOGENESIS KANKER PAYUDARA TIKS BETINA
YANG DIINDUKSI DENGAN DMBA**

SKRIPSI



Oleh :

**WERRY YASHIMA SAPUTRA
K 100 060 221**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2010**

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Kanker adalah pertumbuhan dan perkembangan sel tubuh yang abnormal dan tidak terkontrol, diikuti proses invasi ke jaringan sekitar dan penyebaran ke bagian tubuh lain (King, 2000). Angka kejadian kanker di Amerika Serikat pada tahun 2008 sebesar 1.437.180 dengan angka kematian sebesar 565.650 (Jemal *et al.*, 2008), sedangkan pada tahun 2005 jumlah penderita kanker di Indonesia mencapai 6 % dari populasi (Anonim, 2009) dan menempati urutan yang keenam sebagai penyebab kematian setelah penyakit jantung (Mulyadi, 1997). Kanker dapat terbagi menjadi kanker ginjal, kanker rahim, kanker kulit, kanker prostat, kanker gastrointestinal, kanker kolon, kanker hati, dan kanker payudara. Di antara berbagai jenis kanker tersebut yang paling banyak ditakuti oleh kaum wanita adalah kanker payudara.

Kanker payudara terjadi karena ketidaknormalan sel dalam saluran susu dari payudara yang tumbuh tidak terkontrol, ketidaknormalan sel ini bisa menginvasi jaringan di sekitar payudara (Zorbas, 2008). Penyebab dari kanker payudara adalah faktor lingkungan, genetik (keturunan) dan hormon, terutama hormon estrogen (Tianing *et al.*, 2002). Jumlah penderita kanker payudara menempati urutan ke dua setelah kanker leher rahim di Indonesia (Ganiswara dan Nafrialdi, 2005).

Masalah utama yang dihadapi sekarang adalah banyaknya jumlah penderita serta besarnya biaya pengobatan kanker. Oleh karena itu, perlu dilakukan upaya pencegahan primer, deteksi secara dini dan teknik pengobatan yang tepat. Sampai saat ini kanker payudara belum dapat diobati secara tuntas, sehingga masih mungkin untuk tumbuh pada jaringan lain. Hal ini disebabkan mekanisme terjadinya kanker belum diketahui dengan jelas, sehingga pengobatan yang digunakan belum sempurna (Frei, 1988 *cit* Tianing *et al.*, 2002). Pembedahan dan kemoterapi masih merupakan pilihan yang terbaik, tapi tingkat keberhasilannya masih rendah. Oleh karena itu, keinginan untuk mengembangkan senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan sel kanker sangat intensif dilakukan dalam satu dekade terakhir. Senyawa-senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan kanker atau mengurangi kemungkinan kembali tumbuhnya sel kanker disebut agen kemopreventif (Manson *et al.*, 2000).

Salah satu strategi untuk pengembangan agen kemopreventif adalah dengan menemukan senyawa baru yang mendasarkan target aksinya pada gen-gen yang meregulasi pertumbuhan, diferensiasi dan/atau kematian sel. Gen pengatur onkogen ini berfungsi sebagai pemacu perkembangan sel dan *tumor suppressor gene* sebagai penghambat perkembangan sel (Meiyanto *et al.*, 2004). Beberapa bahan aktif tanaman banyak dilaporkan mempunyai aktifitas sebagai antikanker.

Salah satu tanaman obat di Indonesia yang dapat dikembangkan sebagai antikanker adalah kluwih (*Artocarpus communis* L) (Ragone, 2001). Penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa akar kluwih (*Artocarpus altilis*) mempunyai aktifitas antituberkolosis dan antiplasmodial, dan juga menunjukkan aktivitas

sitotoksik pada sel MCF-7 (Boonphong *et al.*, 2007). Ekstrak etanol daun kluwih memiliki aktifitas sitotoksik terhadap sel murine P-388 leukimia (Lotulung *et al.*, 2008) dan ekstrak etanol kulit batangnya mempunyai efek sitotoksik terhadap sel Hela dengan IC₅₀ sebesar 19,90 µg/ml (Khasanah, 2007). Ekstrak metanol kulit kayu *Artocarpus communis* J.R.&G mempunyai efek sitotoksik terhadap sel Hela dengan IC₅₀ sebesar 17,82 µg/ml (Salasiah, 2007). Senyawa-senyawa hasil isolasi *Artocarpus communis* J.R.&G yakni artonin E dan artokarpin (senyawa turunan flavonoid) memiliki aktifitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 dengan IC₅₀ sebesar 2,2 µg/ml (Syah, 2005).

Sejauh ini belum ada penelitian mengenai efek kemopreventif ekstrak metanol kulit kayu *Artocarpus communis* J.R. & G pada karsinogenesis kanker payudara tikus betina yang diinduksi dengan DMBA. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk membuktikan efek kemopreventif ekstrak metanol kulit kayu kluwih pada karsinogenesis kanker payudara tikus betina yang diinduksi dengan DMBA. Hasil penelitian ini dapat dijadikan landasan penggunaan kulit kayu kluwih sebagai agen kemopreventif. Selain itu penelitian ini juga dapat dipergunakan untuk pengembangan penelitian selanjutnya bagi penemuan obat antikanker.

B. Perumusan Masalah

Dengan latar belakang tersebut di atas dapat dirumuskan suatu permasalahan sebagai berikut :

Apakah ekstrak metanol kulit kayu kluwih mempunyai potensi efek kemopreventif pada karsinogenesis kanker payudara tikus betina yang diinduksi

dengan DMBA dan berpotensi dalam mengurangi jumlah dan ukuran diameter sel kanker payudara ?

C. Tujuan Penelitian

Menentukan potensi efek kemopreventif ekstrak metanol kulit kayu kluwih kluwih pada karsinogenesis kanker payudara tikus betina yang diinduksi dengan DMBA dan potensi ekstrak metanol kulit kayu kluwih dalam mengurangi jumlah dan ukuran diameter sel kanker payudara.

D. Tinjauan Pustaka

1. Kanker

Kanker merupakan pertumbuhan sel yang tidak terkontrol diikuti proses invasi ke jaringan sekitar dan penyebarannya (*metastatis*) ke bagian tubuh yang lain. Sifat utama sel kanker adalah hilangnya kontrol pertumbuhan dan perkembangan sel kanker tersebut (King, 2000). Sel kanker mempunyai enam karakter khusus (Pecorino, 2005), yaitu :

a. *Growth signal autonomy*

Sel normal memerlukan sinyal eksternal untuk pertumbuhan dan pembelahannya. Akan tetapi, sel kanker mampu memproduksi *growth factors* dan *growth factor receptors* sendiri sehingga dapat memperpendek *growth factor pathways*.

b. *Evasion growth inhibitory signals*

Sel *normal* merespon sinyal penghambatan pertumbuhan untuk mencapai homeostasis. Jadi ada waktu tertentu bagi sel normal untuk proliferasi dan

istirahat sedangkan sel kanker tidak mengenal dan tidak merespon sinyal penghambatan pertumbuhan sehingga dapat terus tumbuh. Keadaan ini disebabkan adanya mutasi pada beberapa gen (proto-onkogen) pada sel kanker.

c. *Evasion of apoptosis signals*

Sel normal akan dikurangi jumlahnya dengan mekanisme apoptosis, bila ada kerusakan DNA yang tidak bisa lagi direparasi, sedangkan sel kanker tidak peka terhadap sinyal apoptosis (padahal sel kanker membawa *acumulative DNA error* yang sifatnya *irreversible*). Kegagalan sel kanker dalam merespon sinyal apoptosis lebih disebabkan karena mutasinya gen-gen regulator apoptosis dan gen-gen sinyal apoptosis.

d. *Unlimited replicative potential*

Sel normal mengenal dan mampu menghentikan pembelahan selnya bila sudah mencapai jumlah tertentu dan mencapai pendewasaan. Penghitungan jumlah sel ini ditentukan oleh pemendekan telomere pada kromosom yang akan berlangsung setiap ada replikasi DNA.

Sel kanker tetap menjaga telomere tetap panjang, hingga memungkinkan untuk tetap membelah diri. Kecacatan dalam regulasi pemendekan telomere inilah yang memungkinkan sel kanker memiliki potensi pertumbuhan yang tak terbatas.

e. *Angiogenesis (Formation of blood vessels)*

Sel normal memiliki ketergantungan terhadap pembuluh darah untuk mendapatkan suplai oksigen dan nutrient yang diperlukan untuk hidup. Namun, arsitektur pembuluh darah sel normal lebih seherhana atau konstan sampai dengan sel itu dewasa.

Sel kanker mampu menginduksi angiogenesis, yaitu pertumbuhan pembuluh darah baru di sekitar jaringan kanker. Pembentukan pembuluh darah baru ini diperlukan untuk survival sel kanker dan ekspansi ke bagian lain dari tubuh (metastase).

f. *Invasion and metastasis*

Normal sel memiliki kepatuhan untuk tidak berpindah ke lokasi lain di dalam tubuh. Perpindahan sel kanker dari lokasi primernya ke lokasi sekunder atau tersiernya merupakan faktor utama adanya kematian yang disebabkan karena kanker.

Mutasi memungkinkan peningkatan aktivitas enzim-enzim yang terlibat invasi sel kanker (MMPs), selain itu juga memungkinkan berkurangnya atau hilangnya adesi antar sel oleh molekul-molekul adisi sel, meningkatnya *attachment*, degradasi, dan migrasi.

Kanker tidak bisa menyerang sel normal dengan begitu saja, akan tetapi disebabkan oleh beberapa faktor penyebab (karsinogen) yang dapat menginduksi terjadinya kanker. Adapun faktor penyebab terjadinya kanker (karsinogen) antara lain:

1). Senyawa kimia (zat karsinogen)

Senyawa kimia bisa menyebabkan terjadinya kanker misalnya ter atau jelaga berupa cairan atau gas sebagai hasil pembakaran zat biologi seperti kayu. Di dalam ter banyak mengandung karsinogen berupa benzena, toluen, fenol, areosol. Pada biji kacang-kacangan yang ditumbuhi jamur *Aspergillus flavus*

terdapat aflatoksin yang merupakan karsinogen alami dan dapat menyebabkan kanker hati (Sukardja, 2004).

2). Faktor fisika

Faktor fisika yang terutama adalah radiasi. Pengaruh radiasi pada molekul DNA dapat menimbulkan :

- a). Perubahan yang dapat kembali (reversibel)
- b). Molekul DNA berubah (rusak) dan sel akan mati
- c). Terjadi perubahan pada molekul DNA yang tidak dapat kembali (irreversibel) dan mulai terjadinya kanker (Mulyadi, 1997).

3). Hormon

Pengamatan klinik pada manusia menunjukkan bahwa terjadinya kanker dan sifat karsinoma payudara, endometrium, dan prostat dipengaruhi oleh hormon-hormon endogen atau eksogen (Velde *et al.*, 1996).

4). Virus

RSV dapat menyebabkan kanker pada ayam, leukemia pada burung dan mamalia, MPV menyebabkan limphoma pada ayam (Mulyadi, 1997). Virus papiloma manusia (HPV) menyebabkan perubahan paraneoplas dan neoplastik di dalam servik uteri. Kanker pada sel hepar yang disebabkan virus hepatitis B (HBV) (Velde *et al.*, 1996).

2. Kanker Payudara

Kanker payudara adalah sekelompok sel yang tidak normal yang terus tumbuh dan bertambah yang pada akhirnya sel-sel ini mungkin akan menjadi benjolan pada payudara. Bila kanker tidak dihilangkan atau dikontrol, maka sel-

sel kanker dapat menyebar keseluruh bagian tubuh dan mungkin akan mengakibatkan kematian (Anonim, 2007). Kanker payudara merupakan yang paling ditakuti oleh banyak orang terutama oleh wanita. Sebanyak 78% kanker payudara terjadi pada usia 50 tahun ke atas dan hanya 6% yang terjadi pada usia kurang dari 40 tahun (Anonim, 2008), tidak hanya di negara maju tapi juga di negara yang sedang berkembang termasuk Indonesia karsinoma payudara lebih banyak dibandingkan dengan karsinoma *servik uteri* yaitu dengan rasio 5:1 (Ganiswara dan Nafrialdi, 2005).

Sekitar 50% kasus kanker payudara merupakan kanker yang tergantung estrogen dan 30% merupakan kanker yang positif mengekspresi HER-2 yang berlebih. Kedua protein tersebut selain berperan dalam metastasis, juga berperan dalam perkembangan kanker payudara (*Early Cancer Development*) (Foster *et al.*, 2001). Estrogen berikatan dengan ER membentuk kompleks reseptor aktif dan mempengaruhi transkripsi gen yang mengatur proliferasi sel. Estrogen dapat memacu ekspresi protein yang berperan dalam *cell cycle progression* seperti *Cyclin D1*, *CDK4* (*cyclin-dependent kinase 4*), *Cyclin E* dan *CDK2*. Aktivasi reseptor estrogen juga berperan dalam aktivasi beberapa onkoprotein seperti *Ras*, *Myc*, dan *Cyc D1* (Foster *et al.*, 2001). Aktivasi protein ini mengakibatkan adanya pertumbuhan yang berlebihan melalui aktivasi onkoprotein yang lain seperti *PI3K*, *Akt*, *Raf*, dan *ERK*. *Protein Myc* merupakan protein yang penting untuk pertumbuhan, sedangkan *Cyc D1* merupakan protein yang berperan dalam kelangsungan *cell cycle progression* sehingga adanya aktivasi tersebut akan

mengakibatkan perkembangan kanker yang dipercepat (Hanahan dan Weinberg, 2000).

a. Diagnosis

Kanker payudara menempati urutan yang kedua setelah kanker rahim. Terdapat tiga cara utama untuk melakukan deteksi dini terhadap kanker payudara, yaitu SADARI (Periksa Payudara Sendiri) atau *breast selfexamination*, sebaiknya mulai biasa dilakukan pada sekitar usia 20 tahun, minimal dilakukan 3 hari setelah haid berhenti atau 7 hingga 10 hari dari haid. Kedua, lakukan pemeriksaan oleh tenaga kesehatan atau *clinical breast examination* dan ketiga, lakukan *mammografi*, yaitu pemeriksaan penunjang dengan X-ray pada payudara. Tujuannya untuk memastikan ada-tidaknya perubahan pertanda kanker payudara yang tidak terlihat saat pemeriksaan fisik. Pemeriksaan ini cukup efektif untuk wanita berusia di atas 40 tahun. Bila terjadi benjolan, dilakukan :

- 1). Pemeriksaan USG, *mammografi*, MRI
- 2). Pemeriksaan pertanda tumor: CA 15-3, MCA dan CEA
- 3). Diagnosis pasti ; pemeriksaan hispatologis yang bahannya diambil dari biopsi benjolan di payudara.

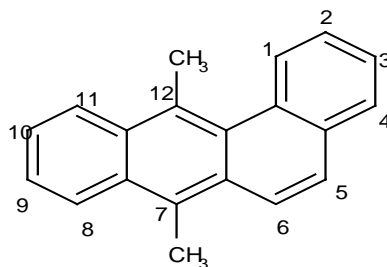
b. Faktor Resiko

Penyebab pasti dari kanker payudara belum diketahui dengan pasti, tapi ada beberapa faktor resiko yang dapat meningkatkan kemungkinan terjadinya kanker payudara. Beberapa diantaranya sebagai berikut :

- 1). Riwayat keluarga dengan kanker payudara, kanker ovarium, endometrium, kolorektal, prostat, tumor otak, leukemia, sarkoma.

- 2). Faktor hormon ; haid pertama <10 tahun, menopause >55 tahun, tidak menikah/melahirkan anak, melahirkan anak pertama >35 tahun, tidak pernah menyusui anak.
 - 3). Payudara pernah infeksi, trauma, operasi tumor jinak atau ganas.
 - 4). Pernah menggunakan obat hormonal yang lama, seperti terapi sulih hormon, dan pengobatan kemandulan.
 - 5). Konsumsi alkohol dan makan makanan yang berlemak tinggi
 - 6). Faktor geografik
 - 7). Hiperplasia atipik pada hasil pemeriksaan biopsi sebelumnya
- (Underwood, 2000)

3. Senyawa Penginduksi Sel Kanker Payudara 7,12 – dimethylbenz(*a*)anthracene (DMBA)

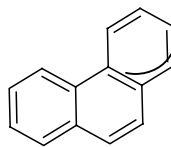


(7,12 – dimethylbenz(*a*)anthracene)

Gambar 1. Struktur 7,12 – dimethylbenz(*a*)anthracene (DMBA)

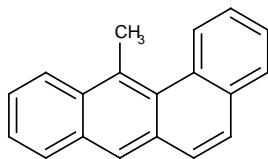
Banyak senyawa dari golongan PAH yang sering digunakan dalam percobaan karsinogenesis. Umumnya senyawa golongan ini merupakan produk *pyrolysis* dari minyak, bahan-bahan biologi, turunan tembakau, pembakaran batubara dan gas. Gugus induk dari senyawa ini adalah *phenantrene* yang terdiri dari tiga cincin benzen. Penambahan cincin dan substituen lain bisa menyebabkan struktur phenantrene menjadi tidak aktif sebagai karsinogen. Minimum yang

dibutuhkan untuk menjadi karsinogen adalah tiga cincin aromatik dalam konfigurasi *phenanthrene*, penambahan cincin, dan/atau gugus metil. Penambahan cincin hanya efektif ketika ditambahkan pada posisi tertentu. Penambahan dua gugus metil pada bay region dari *benzanthracene* (*12-methylbenzanthracene*) menjadi DMBA merupakan karsinogen yang paling poten.

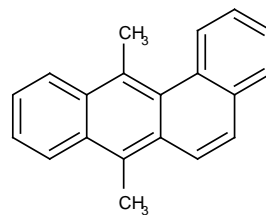


K region

Phenanthrene (tidak aktif)



(12 – *dimethylbenz(a)anthracene*)
Aktif



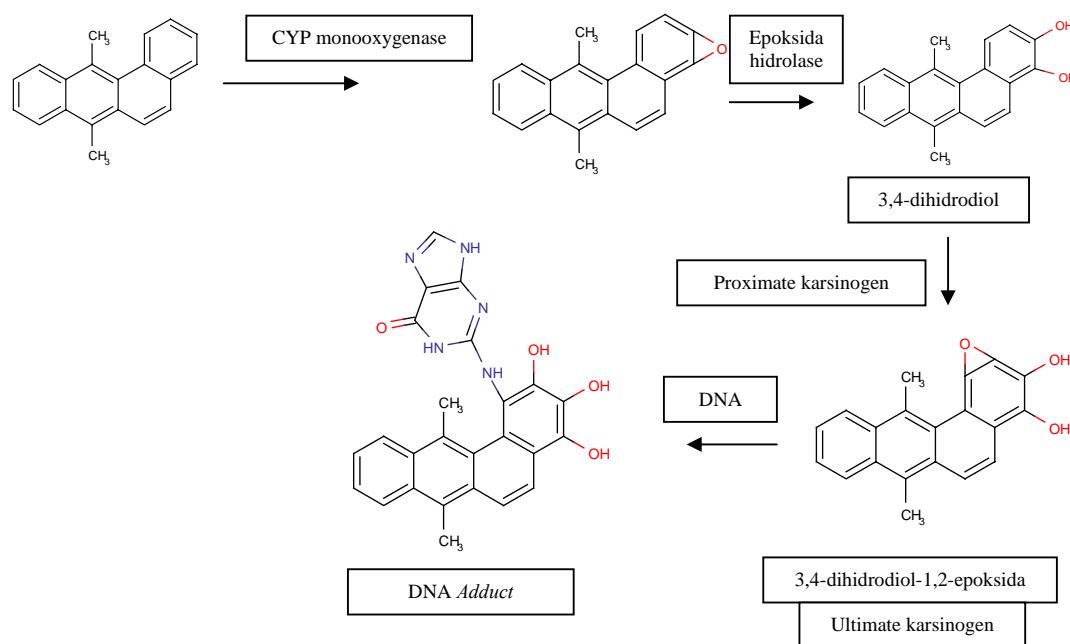
(7,12 – *dimethylbenz(a)anthracene*)
Sangat aktif

Gambar 2. Potensi Karsinogenik dari Polisiklik Aromatik Hidrokarbon

(King, 2000)

Karsinogen golongan PAH ini memerlukan aktivasi metabolisme untuk menjadi reaktif, yaitu melalui enzim sitokrom P-450 yang akan membentuk *proximate carcinogen* (suatu metabolit intermediet yang akan mengalami metabolisme menjadi *ultimate carcinogen*. *Ultimate carcinogen* merupakan metabolit akhir dari karsinogen induk yang akan merusak DNA melalui pembentukan epoksida dihidrodiol dan kation radikal. Epoksida dihidrodiol

mengikat gugus amino eksosiklik purin DNA secara kovalen menjadi adduct yang stabil, sedangkan kation radikalnya mengikat N7 atau C8 menjadi *adduct* yang tidak stabil yaitu depurinisasi menjadi tempat yang kehilangan apurinik pada DNA (Malendez *et al.*, 1999 ; King 2000). Metabolit DMBA inilah yang akan menjadi *adduct* dengan basa guanine dalam DNA (mutasi) sehingga menyebabkan terjadinya karsinogenesis.



Gambar 3. Aktivasi DMBA dan Pembentukan DNA Adduct

(Melendez *et al.*, 1999 ; King 2000)

Senyawa penginduksi sel kanker payudara DMBA merupakan senyawa yang berbentuk padat, berwarna kuning kehijau-hijauan, bersifat pengoksidasi. Memiliki efek toksik dan iritasi pada proses pencernaan, pernapasan, absorpsi kulit. Senyawa ini digunakan untuk penelitian kimia obat-obat antineoplastik, dimana senyawa ini berfungsi untuk menginduksi tumor. Senyawa ini merupakan

salah satu dari hidrokarbon aromatik polisiklik karsinogenik yang paling poten (Anonim, 2005).

4. Karsinogenesis

Proses perkembangan sel normal menjadi sel kanker disebut karsinogenesis. Karsinogenesis merupakan suatu proses yang bertahap. Tahapan karsinogenesis yaitu

a. Tahap I (inisiasi)

Tahap inisiasi merupakan tahap yang diperlukan untuk pembelahan sel. Pada tahap ini terjadi perubahan genetik yang menetap akibat rangsangan bahan atau agen inisiator yang menimbulkan kerusakan DNA dan sel. Kerusakan DNA dan sel yang terjadi bersifat *irreversible*, respon sel yang termutasi berubah terhadap lingkungan dan tumbuh secara berlebihan sehingga berpotensi sebagai sel kanker. Jika sel normal berproliferasi secara berlebihan dan berkembang menjadi sel kanker maka sel tersebut akan memasuki tahap promosi (Di Piro *et al.*, 2005).

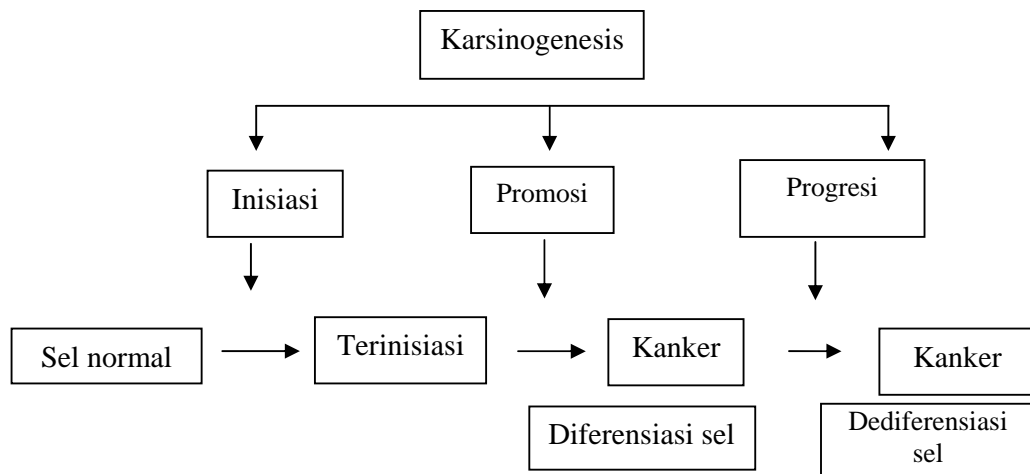
b. Tahap II (promosi)

Tahap ini merupakan tahap yang kedua pada proses karsinogenesis. Dalam tahap ini terjadi perubahan ke arah pra-kanker akibat bahan-bahan promoter. Perubahan yang terjadi akibat pengaruh promoter yang berulang-ulang dan dalam jangka waktu yang lama. Perbedaan antara tahap inisiasi dan tahap promosi adalah sifat tahap promosi yang *reversible* artinya risiko timbulnya kanker akan hilang bila promoternya dihilangkan. Mungkin sifat yang *reversible* inilah yang

menyebabkan pada tahap promosi ini terjadi penghambatan karsinogenesis secara kemopreventif, termasuk perubahan gaya hidup dan diet (Di Piro *et al.*, 2005).

c. Tahap III (progresi)

Tahap akhir dari pertumbuhan sel kanker adalah progresi. Bagian yang paling penting dari tahap ini adalah invasi sel kanker sampai ke jaringan lokal dan menyebar ke tempat yang lebih jauh (metastase). Tahap ini bersifat *reversible* (Di Piro *et al.*, 2005).



Gambar 4. Tahapan Karsinogenesis

(King, 2000)

Karsinogenesis yang disebabkan oleh bahan-bahan kimia sebagai agen penginduksi kanker terbagi menjadi dua tahap, inisiasi dan promosi induksi kanker oleh DMBA. Hidrokarbon dapat menginisiasi kanker kemudian dilanjutkan oleh *croton oil* (promoter) menjadi tahap promosi yang dibutuhkan untuk pengembangan kanker. Tahap inisiasi terjadi akibat pembentukan *kovalen adduct* dari metabolit epoksida DMBA pada basa guanin DNA, sehingga dapat

menyebabkan terjadinya mutasi. Bahan aktif dari *croton oil* (*phorbol ester*, *tetradecanyol phorbol asetat*) mengikat membran reseptor, protein kinase sehingga mengaktifkan *cytoplasmic serine/threonine protein kinase* yang meningkatkan transkripsi gen dan proliferasi sel. Perubahan gen mungkin disebabkan oleh inisiator maupun promotor. Agen promotor dapat menyebabkan perubahan proliferaatif (King, 2000)

Karsinogen polisiklik hidrokarbon paling umum digunakan dalam percobaan karena mudah didapat dan memiliki potensial yang tinggi untuk menimbulkan kanker, sebagai contoh kanker payudara. Pemberian oral DMBA dapat menimbulkan sel kanker payudara tetapi hanya dibawah kondisi yang khusus misalnya pada umur tertentu, ketika kelenjar payudara mulai berkembang, yang mengindikasikan bahwa sel peka terhadap agen inisiator pada tahap tertentu dari perkembangan sel. Dengan demikian, ada hubungan antara karsinogenesis dengan perkembangan sel dimana terjadi perkembangan sel yang berlebihan. Kanker selain kanker payudara biasanya jarang disebabkan oleh DMBA, ini menunjukkan adanya perbedaan sensitivitas dari sel terhadap suatu karsinogen (King, 2000).

Mekanisme penghambatan karsinogenesis oleh DMBA dapat terjadi melalui penghambatan aktivasi metabolisme senyawa DMBA menjadi *proximate carcinogen* dan penghambatan interaksi senyawa *ultimate karsinogen* dari DMBA dengan target makromolekul (DNA). Enzim sitokrom P-450 dan CYP1A yang merupakan enzim pemetabolisme fase I diketahui dapat memetabolisme DMBA menjadi metabolit epoksida (*ultimate carcinogen*) reaktif yang dapat berinteraksi

dengan DNA (*DNA adduct*) dan menyebabkan kerusakan DNA sebagai proses awal karsinogenesis. Ketika aktivitas enzim sitokrom P-450 dan CYP1A dihambat, maka pembentukan senyawa *ultimate carcinogen* akan menurun dan kemampuan untuk memacu terjadinya karsinogenesis(inisiasi) menjadi berkurang. Interaksi antara senyawa karsinogen dengan target makromolekul (*DNA adduct*) juga dapat dihambat dengan adanya detoksifikasi senyawa karsinogen atau *ultimate carcinogen* oleh enzim-enzim pemetabolisme fase II seperti enzim GST dimana GSH yang bersifat *nukleofil* akan berikatan dengan DMBA (*elektrofil*), kemudian enzim GST akan mengkatalisis reaksi ini dan menghasilkan senyawa asam merkapturat yang diekskresikan melalui urin (Murray *et al.*, 2001). Kusharyanti (2004) melaporkan bahwa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanolik daun *Gynura procumben* mampu menginduksi enzim GST pada tikus jantan yang diberi DMBA dengan meningkatkan ekspresi enzim glutathion S-transferase (GST) yang dapat mendetoksifikasi karsinogen reaktif menjadi tidak reaktif dan lebih polar sehingga cepat dieliminasi dari tubuh, selain itu juga flavonoid dapat mengikat senyawa karsinogen sehingga mencegah ikatan dengan DNA (Ren *et al.*, 2003).

Efek antiproliferatif dari beberapa senyawa yang berpotensi antikanker salah satunya diketahui melalui kemampuannya dalam menunda siklus sel. Flavonoid dapat menginduksi G1 *arrest* (Matsukawa *et al.*, 1993 cit Pan *et al.*, 2002) seperti yang dilaporkan Pan *et al.*, (2002) bahwa flavonoid (tangeretin) yang terdapat pada kulit jeruk, dapat menginduksi G1 *arrest* dengan adanya peningkatan Cdk Inhibitors seperti p27, p21 pada *colon cancer cell line*.

Kluwih telah diketahui memiliki beberapa senyawa aktif sitotoksik yaitu 1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-[8-hydroxy-2-methyl-2-(4-methyl-3-pentenyl)-2H-1-benzopyran-5-yl]1-propanone (Lotulung *et al.*, 2008), artonin E (Boonphong *et al.*, 2007 ; Suhartati *et al.*, 2008) yang termasuk senyawa flavonoid golongan flavon/flavonol. Senyawa flavonoid memungkinkan penghambatan karsinogenesis melalui beberapa mekanisme antara lain penghambatan aktifitas enzim sitokrom P-450, menghambat aktifitas isoenzim CYP1A (Meiyanto *et al.*, 2007), induksi aktifitas glutathion S-transferase (Ren *et al.*, 2003 ; Kusharyanti, 2004), menghambat Cdk dan meningkatkan level p53 yang menyebabkan terjadinya *cell cycle arrest* (Pan *et al.*, 2002).

5. Kemopreventif

Kemoterapi atau kuratif adalah penghambatan pertumbuhan sel kanker dimana zat penginhibisinya (penghambat) diberikan setelah zat penginduksinya diberikan, sedangkan kemopreventif adalah penghambatan pertumbuhan sel kanker dimana zat penginhibisinya (penghambat) diberikan sebelum atau bersamaan dengan zat penginduksinya. Kemopreventif ini bisa menggunakan agen-agen penghambat farmakologi alami yang secara tipikal menghambat perkembangan sel kanker. Agen-agen penghambat harus memenuhi tingkat keamanan dan efikasi yang memenuhi standar untuk terapeutic (Alison, 2003).

Pengembangan agen kemopreventif didasarkan pada regulasi daur sel termasuk reseptor-reseptor hormon pertumbuhan dan protein kinase, penghambatan angiogenesis, penghambatan enzim COX-2, dan induksi apoptosis.

Ketidaknormalan pada daur sel dan regulasi apoptosis, peningkatan enzim COX-2, dan proses angiogenesis hanya terjadi pada sel kanker sehingga agen kemopreventif relatif aman dan tidak berpengaruh pada sel normal (Chang dan Kinghorn, 2001).

Tumor dan kanker ganas yang terjadi akan memicu ekspresi COX-2 yang berlebih dimana peningkatan ekspresi COX-2 ini diikuti produksi PGE₂ yang berperan dalam proses proliferasi dan memacu angiogenesis sel kanker (King, 2000). Agen kemopreventif mempunyai kemampuan dalam menghambat COX-2 sehingga dapat menurunkan transformasi sel malignan (Surh *et al.*, 2003).

Keabnormalan sel kanker salah satunya disebabkan oleh disregulasi siklus sel, yaitu terjadinya ketidak teraturan sel dalam berkembang karena mekanisme kontrol yang tidak sesuai sebagaimana pada sel normal (Gondhowiardjo, 2004). Terdapat Retinoblastoma dan P53 sebagai gen penekan tumor yang berfungsi untuk mengatur proses apoptosis yang disebabkan kerusakan DNA dan berperan penting pada siklus sel sebagai materi antiproliferasi. Pada saat terjadi inaktivasi gen penekan tumor (P53), maka sel akan berproliferasi secara berlebihan. Efek antiproliferasi dari senyawa yang berperan sebagai antikanker adalah kemampuannya dalam menunda siklus sel dengan menghambat aktivitas *cyclin*-CDK dan protein kinase lainnya. Agen kemopreventif alami, di antaranya flavonoid, berperan dalam menghambat siklus sel terutama fase G1 sehingga sel akan berhenti membelah dan proliferasi sel akan berhenti (Pan *et al.*, 2002).

6. *Argyrophilic Nucleolar Organizer Region (AgNOR)*

Penentuan aktifitas proliferasi sel pada sel tumor dapat dilakukan dengan berbagai teknik seperti autoradiograf, flow sitometri teknik dengan antibodi monoklonal Ki 67, teknik BLI dan teknik silver atau AgNOR. Teknik AgNOR mempunyai kelebihan dibandingkan teknik lain yaitu dapat dilakukan pada jaringan yang telah difiksasi secara konvensional (Rizali dan Auerkari, 2003). NOR adalah DNA lup pada tangan pendek 5 kromosom akrosentrik (13, 14, 15, 21, dan 22) dari nukleoli sel-sel, dan berhubungan dengan aktivitas gen ribosomal RNA sintesa protein dan proliferasi sel (Rizali dan Auerkari, 2003 ; Lee *et al.*, 1999). Protein yang berhubungan dengan NOR (RNA *polymerase*, protein B23, C23 atau nukleolin) dikode oleh gen yang ada pada NOR sehingga dapat dikenali sebagai titik hitam kecil pada nukleus dengan teknik pewarnaan silver (AgNOR) (Lee *et al.*, 1999). Jumlah AgNOR pernukleus berhubungan dengan aktivitas proliferasi sel. AgNOR protein, nukleolin dan pB23 selama interfase, subunit RNA *polymerase* dan faktor transkripsi UBF selama mitosis, berperan penting dalam kontrol transkripsi ribosomal RNA dan dikenal sebagai penanda aktivitas gen ribosomal (Bankfalvi *et al.*, 2002).

Penghitungan AgNOR ditemukan berhubungan langsung dengan *doubling time human tumour* baik secara *in vivo* atau *in vitro* (Bankfalvi *et al.*, 2002). Penghitungan AgNOR sebagai penanda proliferasi tampaknya bermanfaat untuk diagnosis sitopatologi pada beragam bentuk malignant, termasuk kanker payudara (Lee *et al.*, 1999 ; Bankfalvi *et al.*, 2002).

Terdapat 2 macam teknik penghitungan silver (AgNOR) yaitu cara m AgNOR (mean=rata-rata) dan cara p AgNOR (*proliferatif indeks*). Cara m AgNOR merupakan rata-rata dari pembagian seluruh jumlah titik hitam (dot) dalam sel dengan seluruh jumlah sel yang diamati, pada pengamatan minimal 100 sel. Sedangkan cara p AgNOR merupakan prosentasi jumlah sel dengan titik hitam (dot) di atas 5 terhadap keseluruhan jumlah sel yang diamati, pada pengamatan minimal 100 sel. Cara mAgNOR dapat menentukan jumlah kromosom secara keseluruhan sedangkan cara pAgNOR dapat menentukan besarnya aktivitas proliferasi sel (Rizali dan Auerkari, 2003).

7. *Artocarpus communis* J.R & G

a. Klasifikasi Tanaman Kluwih

Sinonim	: <i>Artocarpus communis</i> J.R. & G.; <i>Artocarpus incisa</i> (Thunb.) L.f.
Devisio	: Spermatophyta
Sub divisio	: Aangiospermae
Classis	: Dicotyledoneae
Subclasis	: Monoclamydeae/ Apetalae
Ordo	: Urticales
Famili	: Moraceae
Genus	: <i>Artocarpus</i>
Spesies	: <i>Artocarpus communis</i> J.R. & G)
Nama dagang	: Kluwih

(Becker *et al.*, 1965 ; Tjitropsoepomo *et al.*, 1988)

b. Nama Daerah Kluwih

Sumatera	: Gomu (Melayu), Kulu (Aceh), Kulur (Batak), Kalawi (Minangkabau), Kaluwih (Lampung)
Jawa	: Kelewih (Sunda) Kluwih (Jawa) Kolor (Madura)
Bali	: Kalewih (Bali)
NusaTenggara	: Kolo (Bima) Lakuf (Timor)
Sulawesi	: Gamasi (Makassar) Kuloro (Selayar) Ulo (Bugis)
Maluku	: Limes, Unas (Seram) Dolai (Halmahera)

(Sutijopitojo , 1992)

c. Uraian Tanaman

Pohon dengan tinggi 10-25 m, batang tegak, bulat, percabangan simpodial, bergetah, permukaan kasar, coklat. Daun tunggal, berseling, lonjong, ujung runcing, pangkal meruncing, tepi bertoreh, panjang 50-70cm, lebar 25-50cm, pertulangan menyirip, tebal, permukaan kasar, hijau. Bunga tunggal berumah satu, berketiak daun, bunga jantan silindris, panjang 10-20cm, kuning, bunga betina bulat, garis tengah 2-5cm, hijau. Buah semu majemuk, bulat, diameter 10-20cm, berduri lunak, hijau. Biji bentuk ginjal, panjang 3-5cm, hitam. Akar tunggang, coklat (Hutapea, 1994).

d. Kandungan Kimia

Kandungan kimia yang terdapat pada kluwih (*Artocarpus communis* J.R.&G) adalah senyawa-senyawa flavonoid, stilben dan 2-arilbenzofuran terpenilasi atau tergeranilasi yang cenderung memberikan sifat sitotoksik yang kuat (Syah, 2005). Hasil isolasi dari akar *Artocarpus comunnis* J.R.&G

mengandung sembilan *prenylasi flavone* yaitu *cycloartocarpin*, *artocarpin*, dan *chaplashin* yang diisolasi dari ekstrak dikloromethane akar induk, yang mana morusin, *cudraflavone B*, *cycloartobiloxanthone*, artonin E, *cudraflavone C* and *artobiloxanthone* diisolasi dari akar kulit kayu *Artocarpus altilis* (Boonphong *et al.*, 2007).

e. Manfaat

Akar kluwih (*Artocarpus communis*) digunakan sebagai bahan pangan, antituberkolosis dan antiplasmodial aktivitas sitotoksik pada sel kanker payudara (Boonphong *et al.*, 2007), daunnya mempunyai aktifitas sitotoksik terhadap sel murine P-388 leukimia (Lotulung *et al.*, 2008), getahnya untuk mengobati patah tulang, keseleo, pegal-pegal pada pinggang, daunnya untuk mengobati penyakit hati dan demam (Lin *et al.*, 1992), ekstrak bunga untuk edema telinga (Koshihara *et al.*, 1988).

f. Penelitian Sebelumnya

Daun kluwih (*Artocarpus communis* J.R.&G)) mengandung senyawa *1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-[8-hydroxy-2-methyl-2-(4-methyl-3-pentenyl)-2H-1benzopyran-5-yl]1-propanone* yang diidentifikasi sebagai *prenylasi flavonoid* yang memiliki aktifitas sitotoksik terhadap sel murine leukimia P-388 (Lotulung *et al.*, 2008). Ekstrak etanol kulit batangnya mempunyai efek sitotoksik terhadap sel Hela dengan IC₅₀ sebesar 19,90 µg/ml (Khasanah, 2007).

E. Landasan Teori

Hasil isolasi dari akar *Artocarpus communis* J.R.&G mengandung sembilan prenylasi flavone yaitu *cycloartocarpin*, *artocarpin*, dan *chaplashin* yang diisolasi dari ekstrak dikloromethane akar induk, yang mana morusin, *cudraflavone* B, *cycloartobiloxanthone*, artonin E, *cudraflavone* C dan *artobiloxanthone* diisolasi dari akar kulit kayu yang mempunyai aktifitas antituberkulosis dan antimalaria dan juga menunjukkan sitotoksik pada sel MCF-7 (Boonphong *et al.*, 2007). Ekstrak etanol kulit batangnya mempunyai efek sitotoksik terhadap sel Hela dengan IC_{50} sebesar 19,90 $\mu\text{g/ml}$ (Khasanah, 2007). Ekstrak metanol kulit kayu kluwih mempunyai efek sitotoksik terhadap sel Hela dengan IC_{50} sebesar 17,82 $\mu\text{g/ml}$ (Salasiah, 2007). Senyawa-senyawa hasil isolasi *Artocarpus communis* J.R.&G yakni artonin E dan artokarpin (senyawa turunan flavonoid) memiliki aktifitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 dengan IC_{50} sebesar 2,2 $\mu\text{g/ml}$ (Syah, 2005).

Senyawa 7,12-dimetilbenz(*alfa*)antrasen (DMBA) merupakan karsinogen yang spesifik membentuk kanker payudara pada beberapa model percobaan dengan cara pemberian per oral. Senyawa karsinogen ini DMBA yang telah mengalami aktivasi metabolisme akan bersifat elektrofilik dan terjadi ikatan kovalen dengan bagian nukleofilik pada target molekul dalam sel yaitu DNA membentuk *DNA adduct*. *DNA adduct* merupakan bentuk mutasi dari DNA. Apabila mutasi ini tidak dapat diperbaiki maka akan terjadi karsinogenesis. Aktivasi DMBA menjadi *ultimate karsinogen* ini biasanya dilakukan oleh enzim sitokrom P-450 (Gregus dan Klaasen, 2001). Penghambatan aktifitas enzim

sitokrom P-450 oleh flavonoid dapat menghambat pembentukan *ultimate karsinogen* (Meiyanto *et al.*, 2007).

Penelitian Zhai *et al.* (1998) melaporkan bahwa beberapa senyawa flavonoid memiliki potensi dan selektifitas yang tinggi menghambat isoenzim CYP1A, suatu keluarga dari sitokrom P-450 yang bertanggung jawab terhadap aktivasi DMBA. Selain itu, adanya kandungan senyawa flavonoid dimungkinkan dapat menginduksi aktivitas glutathione-S-transferase yang mendetoksifikasi metabolit DMBA (epoksida) sehingga dapat diekskresikan (Ren *et al.*, 2003).

Dengan adanya fakta-fakta tersebut diharapkan ekstrak metanol kulit kayu kluwih juga mampu menghambat pertumbuhan kanker payudara tikus betina galur *Sprague Dawley* karena induksi DMBA pada tahap sebelum dan selama proses inisiasi .

F. Hipotesis

Pemberian ekstrak metanol kulit kayu kluwih pada karsinogenesis kanker payudara tikus betina yang diinduksi DMBA dimungkinkan dapat :

1. Menurunkan angka kejadian tumor payudara yang diinduksi DMBA
2. Mengurangi jumlah dan ukuran diameter sel kanker payudara.